

PCT/JP99/05979

09785728
JPSS 105379

28.10.99

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 20 DEC 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 7月27日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第212096号

出願人
Applicant(s):

住友ベークライト株式会社

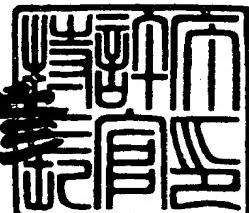
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月 3日

特許長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆



出証番号 出証特平11-3083901

【書類名】 特許願
【整理番号】 PK990710

【提出日】 平成11年 7月27日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 33/00
【発明の名称】 免疫分析用容器
【請求項の数】 3

【発明者】

【住所又は居所】 秋田市土崎港相染町字中島下 27-4 秋田住友ペーク
株式会社内
【氏名】 田中 速雄

【特許出願人】

【識別番号】 000002141
【住所又は居所】 東京都品川区東品川二丁目5番8号
【氏名又は名称】 住友ペークライト株式会社
【代表者】 守谷 恒夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003539
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 免疫分析用容器

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 容器の試薬溶液と接触する基材部分が親水性材料で成形されているか又は基材部分の表面が親水性材料で覆われていることを特徴とする免疫分析用容器。

【請求項 2】 容器の試薬溶液と接触する基材部分が親水化処理されていることを特徴とする免疫分析用容器。

【請求項 3】 親水性材料もしくは親水化処理された表面の接触角が 30 度以下である請求項 1 又は 2 記載の免疫分析容器。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗原抗体反応を利用して抗体又は抗原を検出する免疫分析における、試薬や検体の保存、希釈又は反応に用いる容器の材質及び表面処理に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

従来の免疫分析において、使用する試薬または検体の保存及び希釈にポリスチレン又はポリプロピレン製の容器を使用しているが、これらの容器を用いた場合、容器に非特異的吸着性があるため、試薬又は検体の種類により差はあるが容器への物理吸着による試薬の減少及び試薬溶液濃度の変化が避けられぬ現象として起こる。

又、測定に使用する容器においても、固相化法と呼ばれる免疫分析法では、容器表面に固相化させた蛋白を利用して分析を行うため容器表面に固相化試薬量を増やすため水酸基等の官能基を導入し親水-疎水のバランスを調節する事で飽和吸着量を増やす、いわゆる高吸着処理がなされたものが使用されていた。しかし近年、容器表面に蛋白を固相化させないシンチレーション・プロキシミティー・アッセイ (SPA 法) といった逐次添加法が開発され、反応物と未反応物の分離

を必要としないこの方法は、自動機に合った測定法として注目されている。

【0003】

逐次添加法においては、反応の際に分子の固相化は行わず、反応は溶液中若しくは溶液中のビーズ等の担体において行われる。よって、容器表面において不必要的吸着が生じると溶液中の反応を阻害したり、又は効率を低下させてしまう。

ところが、現在それらに使用されている容器は吸着に対して考慮されておらず、ポリスチレン又はポリプロピレンといった成形性、透明性又は耐低温性のみを考慮した材料を特に吸着を抑えるための表面処理もせずに用いられているのが現状であり、試薬のロス及び感度の低下の問題を容器の吸着特性の方向から解決するといったアプローチもあまりなされていない。

【0004】

しかし、今までに免疫分析容器表面の非特異的吸着を制御する為にいくつかの技術が検討され実施されている。

例えば、最も一般的に行われている方法としては、測定系に対して不活性な蛋白質をコーティングするいわゆるブロッキングと呼ばれる方法であるが、この方法は基本的に蛋白質の非特異的吸着を利用しているため、コーティング毎にブロッキング効果がばらつきやすく、蛋白質の状態によっても効果は左右されやすい。又不活性な蛋白質は非特異的吸着をしているだけであるので簡単に溶液中に遊離してしまうため保存用には用いることは出来ない。特開平6-174726号公報及び特開平7-128336号公報には蛋白質を化学的に固定化する事で前述の様な遊離を無くす技術が開示されているが、蛋白質は乾燥、保存温度さらに保存期間によって構造変化を起こす可能性が高いので実際の容器として汎用性は望めなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上述のような従来の問題点を解決すべく銳意検討の結果なされたもので、免疫分析容器表面を親水性とすることで不要な吸着による反応の阻害又は効率の低下を防止し、更に、保存試薬中の材料の脱離防止、保存性、取扱性の向上を図ることで、試薬の減少や試薬濃度の変化のない免疫分析容器を提供する

ことを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

即ち本発明の第1の発明は、容器の試薬溶液と接触する基材部分が親水性材料で成形されているか又は基材部分の表面が親水性材料で覆われていることを特徴とする免疫分析用容器であり、第2の発明は容器の試薬溶液と接触する基材部分が親水化処理されていることを特徴とする免疫分析用容器である。さらに親水性材料もしくは親水化処理された表面の接触角が30度以下である免疫分析容器である。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明の容器の形状としては従来用いられているサンプルチューブ、遠沈管、マルチウェルプレート、キュベット等であるが特に限定するものではない。

現在免疫分析容器に用いられている材料は、ポリスチレン又はポリプロピレンといった疎水性の材料であるが、一般的に水溶液中において蛋白質は疎水性表面に吸着しやすく、特に従来より最も多く使用されているポリスチレンに対しては殆どの種類の蛋白質は多量に吸着してしまう。

【0008】

そこで、本発明の特徴とする親水性材料としては、特に限定する物ではないが、例えばPHEMA（ポリヒドロキシエチルメタクリレート）、エチレンビニルアルコール共重合体、MPC（2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン）ポリマー（ハイドロゲルの血液適合性に及ぼす親水性基構造の影響 生体材料 Vol. 9 NO. 6 1991）等が挙げられ、それらの材料で容器自体を成形するのが最も効率の良い方法ではあるが、しかし容器全体が親水性材料で構成されると、分析工程中で容器が変形する可能性もあり好ましくない場合もある。

また、親水性が必要であるのは容器の試薬が接触する部分であるから、市販の免疫分析容器の試薬が接触する部分に親水性材料をコーティングしたりPEG（ポリエチレングリコール）の導入等の親水化表面処理をする事によっても目的を

達成することが可能である。

【0009】

本発明において特に重要であるのは、容器の試薬と接触する部分を親水化する点であり、ポリスチレン又はポリプロピレンといった従来の疎水性の容器では分析に使用する試薬の約20%～50%が容器に吸着されていたものが、親水化により吸着量がその1/5～1/10若しくはそれ以下に抑えられる事によって反応効率すなわち測定感度が上がる。

更に、基材と接触した分子、特に蛋白質が従来の疎水性の容器では構造変化を起こす事で、不必要的反応を引き起こし擬陽性、若しくは擬陰性の原因となっていたが親水化により接触した分子の構造変化が抑えられ、より生体内に存在している状態に近い環境で測定することが出来る。

【0010】

親水化により上記のような効果を得るためにには、基材を成形したりコーティングする親水性材料、あるいは親水化処理後の表面の接触角が30度以下であることが好ましく、30度を超えると分子の種類によっては親水一疎水のバランスによって疎水性表面より吸着量が増えてしまう場合がある。

以下、実施例によって本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0011】

【実施例】

(実施例1)

市販のポリスチレン製チューブ(栄研チューブ RIA用3号 70-12458)の表面にポリーアヒドロキシエチルメタクリレート(SIGMA製 P-3932)の2.0wt/vol%メタノール溶液を2.5mlづつ分注し、溶液を排出後、残留した溶液が底面に溜まらないように裏返した状態で、室温で24時間乾燥させる事でポリーアヒドロキシエチルメタクリレートを表面にコーティングしたプレートを作製した。

【0012】

(実施例2)

市販のポリスチレン製チューブ（栄研チューブ R I A用3号 70-12458）の表面にMPCポリマーの0.5wt/vol%エタノール溶液を2.5mlづつ分注し、室温で10分間放置した後に溶液を排出し、残留した溶液が底面に溜まらないように裏返した状態で、室温で一晩乾燥させてMPCポリマーを表面にコーティングしたチューブを作製した。

尚、MPCポリマーの合成は、「リン脂質類似構造を有するハイドロゲル膜からの薬物放出—高分子論文集、46, 591-595(1989)」の内容に従いMPCとBMA（ブチルメタクリレート）比=3/7の共重合体を作製し使用した。

(比較例)

市販のポリスチレン製チューブ（栄研チューブ R I A用3号 70-12458）をそのまま用いた。

【0013】

(測定感度の比較)

溶液中の反応における測定感度を評価するために、実施例1、実施例2及び比較例の各チューブを反応容器として用い、反応担体としてELISAボール（住友ベークライト製 アミノ基ボール）を用いた測定を実施した。

予め、0.125、0.250、0.500 μ g/mLの濃度系列で調整したビオチンヒドラジド（D o j i n d o 製）のリン酸緩衝液（pH 7.4）溶液を用いてELISAボールにビオチンヒドラジドをグルタルアルデヒドを介して共有結合により固相化し、3段階のビオチンヒドラジド固相化密度のELISAボールを作製した。

尚、ELISAボールの固相化されたビオチンヒドラジド以外の箇所については、スキムミルクにてプロッキングを行い吸着を防止した。

【0014】

実施例1、実施例2及び比較例のチューブ3本に3段階のビオチンヒドラジド固相化密度のELISAボールを入れ、ペルオキシターゼ標識アビシン（Capel社製）の1 μ g/mLリン酸緩衝液（pH 7.4）溶液を500mL/チューブで分注し、室温で30分反応させた。

反応後、洗浄液（リン酸緩衝液pH7.4+0.05%Tween20）で洗浄し、未反応のペルオキシターゼ標識アビジンを洗浄した後、市販のペルオキシダーゼ用発色キット（住友ベークライト製 ML-1120T）を用いて発色、プレートリーダーにより450nmの吸光度を測定した。

【0015】

結果は表1の通りで、実施例においてはELISAボール表面に導入されたビオチンヒドラジド密度に応じて吸光度も直線的に変化しているのに比べ、比較例においては、全ての密度で吸光度に殆ど変化は見られない。

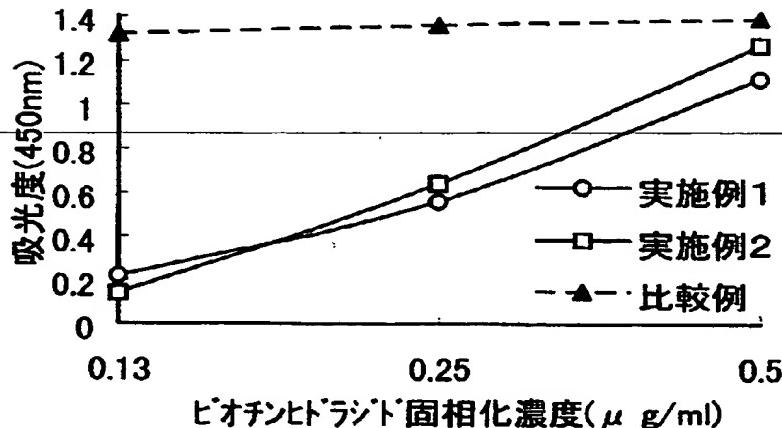
つまり、実施例では、ELISAボール表面に導入されたビオチンヒドラジドに対してのみペルオキシターゼ標識アビジンが反応しており、その結果吸光度はビオチンヒドラジド密度と比例しているが、比較例では、吸着によりチューブに残留したペルオキシターゼ標識アビジンが、バックグラウンドとなって感度が低下したためと考えられる。

【0016】

【表1】

$\mu\text{g/ml}$	実施例1	実施例2	比較例
0.125	0.22	0.14	1.32
0.25	0.56	0.64	1.36
0.5	1.12	1.27	1.39

ELISAボールを用いたビオチニアビジン反応



【0017】

(保存容器としての蛋白回収率の比較)

非特異的吸着性を比較するため、酵素で標識した抗ウシアルブミン抗体（コスマバイオ 製）を0.1ng/ml、1ng/ml、10ng/ml、100ng/mlの濃度系列で、各濃度を24ウェルづつ分注し、-80℃で48時間保存し、保存後の溶液中の蛋白濃度を基質溶液を用いて測定した。

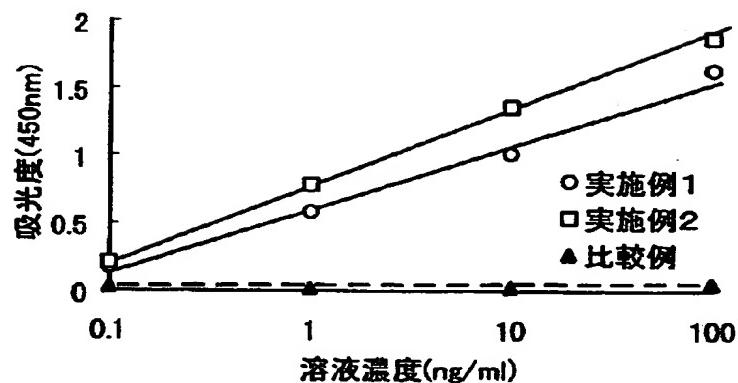
結果は、表2の通りで、実施例1及び実施例2のプレートとともに比較例に比べ蛋白回収率が高いことを確認した。

【0018】

【表2】

ng/ml	実施例1	実施例2	比較例
0.1	0.18	0.21	0.03
1	0.58	0.78	0.02
10	1.01	1.36	0.03
100	1.63	1.87	0.05

保存後の蛋白濃度(吸光度の比較)



【0019】

【発明の効果】

本発明の免疫分析用容器は表面の親水化によって、分析に用いられる分子に対して低吸着性であることから、微量反応及び溶液反応系の測定感度を高めることを可能とし、試薬の保存や希釀容器として用いた場合には吸着による試薬の損失が少ない。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 微量反応、溶液反応系の免疫分析の感度を高めた免疫分析容器。試薬の保存、希釀時に、試薬の損失の少ない免疫分析容器を提供する。

【解決手段】 容器の試薬溶液と接触する基材部分が親水性材料で成形されているか又は基材部分の表面が親水性材料で覆われていることを特徴とする免疫分析用容器であり、又容器の試薬溶液と接触する基材部分が親水化処理されていることを特徴とする免疫分析用容器である。さらに親水性材料もしくは親水化処理された表面の接触角が30度以下の免疫分析容器である。

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第212096号
受付番号	59900719190
書類名	特許願
担当官	伊藤 雅美 2132
作成日	平成11年 8月 5日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】	申請人
【識別番号】	000002141
【住所又は居所】	東京都品川区東品川2丁目5番8号
【氏名又は名称】	住友ベークライト株式会社

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [000002141]

1. 変更年月日 1995年 2月10日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都品川区東品川2丁目5番8号

氏 名 住友ペークライト株式会社